

# IMMUNOTHERAPY OF B-CELL MALIGNANCIES USING ANTI-CD22 ANTIBODIES

**Publication number:** JP2002544173T

**Publication date:** 2002-12-24

**Inventor:**

**Applicant:**

**Classification:**

**- international:**

**A61K38/00; A61K31/166; A61K31/17; A61K31/192;  
A61K31/475; A61K31/519; A61K31/573; A61K31/675;  
A61K31/7048; A61K38/21; A61K39/395; A61K51/00;  
A61P35/00; A61P35/02; C07K16/28; A61K38/00;  
A61K31/166; A61K31/17; A61K31/185; A61K31/475;  
A61K31/519; A61K31/57; A61K31/675; A61K31/7042;  
A61K38/21; A61K39/395; A61K51/00; A61P35/00;  
C07K16/18; (IPC1-7): A61K39/395; A61K31/166;  
A61K31/17; A61K31/192; A61K31/475; A61K31/519;  
A61K31/573; A61K31/675; A61K31/7048; A61K38/00;  
A61K38/21; A61K51/00; A61P35/02**

**- European:**

**A61K39/395; C07K16/28A**

**Application number:** JP20000616820T 20000510

**Priority number(s):** US19990307816 19990510; WO2000US12583  
20000510

**Also published as:**



WO0067795 (A1)



EP1178826 (A1)



EP1178826 (A0)



CA2373618 (A1)



AU774044B (B2)

Report a data error here

Abstract not available for JP2002544173T

Abstract of corresponding document: **WO0067795**

B-cell malignancies, such as the B-cell subtype of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia, are significant contributors to cancer mortality. The response of B-cell malignancies to various forms of treatment is mixed. Traditional methods of treating B-cell malignancies, including chemotherapy and radiotherapy, have limited utility due to toxic side effects. Immunotherapy with anti-CD20 antibodies have also provided limited success. The use of antibodies that bind with the CD22 or CD19 antigen, however, provides an effective means to treat B-cell malignancies such as indolent and aggressive forms of B-cell lymphomas, and acute and chronic forms of lymphatic leukemias. Moreover, immunotherapy with anti-CD22 and/or anti-CD19 antibodies requires comparatively low doses of antibody protein, and can be used effectively in multimodal therapies.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>         | 識別記号                        | F I            | テ-ド <sup>7</sup> (参考)      |
|-----------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------------------|
| A 6 1 K 39/395                    |                             | A 6 1 K 39/395 | D 4 C 0 8 4<br>N 4 C 0 8 5 |
|                                   | 31/166                      | 31/166         | 4 C 0 8 6                  |
|                                   | 31/17                       | 31/17          | 4 C 2 0 6                  |
|                                   | 31/192                      | 31/192         |                            |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く |                             |                |                            |
| (21) 出願番号                         | 特願2000-616820(P2000-616820) | (71) 出願人       | イムノメディクス、 インコーポレイテッド       |
| (86) (22) 出願日                     | 平成12年5月10日(2000.5.10)       |                | アメリカ合衆国、07950 ニュー・ジャー      |
| (85) 翻訳文提出日                       | 平成13年11月12日(2001.11.12)     |                | ジー、モリス・ブレインズ、アメリカン・        |
| (86) 国際出願番号                       | P C T / U S 0 0 / 1 2 5 8 3 |                | ロード 300                    |
| (87) 国際公開番号                       | W O 0 0 / 6 7 7 9 5         | (72) 発明者       | ゴールデンバーグ、 デヴィッド・エム         |
| (87) 国際公開日                        | 平成12年11月16日(2000.11.16)     |                | アメリカ合衆国、07945 ニュー・ジャー      |
| (31) 優先権主張番号                      | 0 9 / 3 0 7 , 8 1 6         |                | ジー、メンダム、プレザント・ヴァリー・        |
| (32) 優先日                          | 平成11年5月10日(1999.5.10)       |                | ロード 30                     |
| (33) 優先権主張国                       | 米国 (U S)                    | (74) 代理人       | 弁理士 奥山 尚一 (外2名)            |
| 最終頁に続く                            |                             |                |                            |

(54) 【発明の名称】 抗CD22抗体を用いたB細胞悪性腫瘍の免疫療法

## (57) 【要約】

非ホジキンリンパ腫および慢性リンパ性白血病のB細胞サブタイプのようなB細胞悪性腫瘍は、癌死亡率へ著しく寄与する一因である。種々の治療形態へのB細胞悪性腫瘍の応答は、混合している。化学療法および放射線療法を含む伝統的なB細胞悪性腫瘍を治療する方法は、毒性の副作用のために利用が制限されてきた。抗CD20抗体を用いる免疫療法もまた限られた成功しか提供していない。しかし、CD22またはCD19抗原と結合する抗体を利用することは、無痛性および急速進行性様態のB細胞リンパ腫、並びに急性および慢性リンパ性白血病などのB細胞悪性腫瘍を治療するための効果的な手段を提供する。更に、抗CD22抗体及び/又は抗CD19抗体を用いる免疫療法は、比較的低用量の抗体蛋白を必要とし、多様的な治療において効果的に用いられることが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 B細胞悪性腫瘍を治療する方法であって、B細胞関連の悪性腫瘍を有する被験者に薬学的に許容される担体および少なくとも1つの裸の抗CD19抗体からなる治療的組成物を投与する段階から成るB細胞悪性腫瘍の治療方法。

【請求項2】 治療的組成物が少なくとも1つの裸の抗CD19抗体と抗CD20抗体との組み合わせから成る請求項1の方法。

【請求項3】 前記抗CD20抗体が、裸の抗CD20抗体である請求項2の方法。

【請求項4】 前記治療的組成物が前記抗体の組み合わせである融合蛋白から成る請求項2の方法。

【請求項5】 前記治療的組成物がさらにサイトカインから成る請求項1の方法。

【請求項6】 B細胞悪性腫瘍を治療する方法であって、1投与につき20～1500mgの投与量で非経口的に投与する、薬学的に許容される担体および少なくとも1つの裸の抗CD22抗体から成る治療的組成物を、B細胞悪性腫瘍を有する被験者に投与する段階から成るB細胞悪性腫瘍の治療方法。

【請求項7】 前記CD22抗体が、1投与につき20～500mgの蛋白の投与量で非経口的に投与される請求項6の方法。

【請求項8】 前記放射性ラベル化した免疫複合体が $^{198}\text{Au}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ および $^{225}\text{Ac}$ から成る群から選択される放射性核種から成る請求項6の方法。

【請求項9】 前記放射性ラベル化した抗CD22免疫複合体はさらにサイトカイン部分を含み、前記サイトカイン部分は、インターロイキン-1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、および、GM-CSFから成る群から選択される請求項6の方法。

【請求項10】 前記治療的組成物が、少なくとも1つの裸の抗CD22抗体と1つの抗CD19抗体との組み合わせ、少なくとも1つの裸の抗CD22抗

体と1つの抗CD20抗体との組み合わせ、または少なくとも1つの標的抗CD22抗体、1つの抗CD19抗体および1つの抗CD20抗体との組み合わせから成る請求項6の方法。

【請求項11】 前記治療的組成物が、抗体の前記組み合わせの融合蛋白から成る請求項10の方法。

【請求項12】 前記抗CD22抗体がヒトに近い重鎖抗体、ネズミのモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体から成る群から選択されることを請求項6の方法。

【請求項13】 前記抗CD22抗体がL12抗体であることを特徴とする請求項12の方法。

【請求項14】 前記治療的組成物が、区別可能なCD22エピトープで結合する少なくとも2つのモノクローナル抗体から成り、前記CD22エピトープが、エピトープA、エピトープB、エピトープC、エピトープDおよびエピトープEから成る基から選択される請求項6の方法。

【請求項15】 前記B細胞悪性腫瘍が、B細胞リンパ腫の無痛型、B細胞リンパ腫の急速進行型、慢性リンパ性白血病および急性リンパ性白血病から成る群から選択される請求項6の方法。

【請求項16】 前記B細胞悪性腫瘍が、非ホジキンリンパ腫であることを請求項15の方法。

【請求項17】 治療的蛋白投与または化学療法治療の段階をさらに含み、前記治療的蛋白が、抗体、免疫複合体、抗体-免疫調節剤融合蛋白および抗体-毒素融合蛋白からなる群から選択される請求項6の方法。

【請求項18】 前記治療的蛋白または前記化学療法治療が、前記抗CD22抗体を投与する前に投与される請求項17の方法。

【請求項19】 前記治療的蛋白または前記化学療法治療が、抗CD22抗体を投与すると同時に投与されることを特徴とする請求項17の方法。

【請求項20】 前記治療的蛋白または前記化学療法治療が、抗CD22抗体を投与した後に投与されることを特徴とする請求項17の方法。

【請求項21】 前記化学療法治療が、シクロフォスファミド、エトポシド

、ビンクリスチン、プロカルバジン、プレドニゾン、カルムスチン、ドキシソルビシン、メトトレキセート、プレオマイシン、デキサメタゾン、フェニル酢酸、プロスタチン-1 およびロイコボリンから成る群から選択される少なくとも1つの薬剤の投与から成る請求項17の方法。

【請求項22】 前記治療的組成物が、抗CD22抗体から成る三価構築物から成ることを特徴とする請求項11の方法。

【請求項23】 前記治療的組成物が、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD19抗体の多特異的構築物から成る請求項11の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### （発明の分野）

本発明は、B細胞悪性腫瘍を治療するための免疫療法の方法に関する。特に、本発明は、CD22抗原に結合したり或いは、CD19抗原に結合する比較的低用量の抗体量を投与することによりB細胞悪性腫瘍を治療するための方法を企図している。本発明は又、抗CD22投与又は抗CD19投与が、化学療法に補足される複合様態の治療法であり、又、免疫複合体及び抗体融合蛋白のような治療的蛋白を投与することによる複合様態の治療的方法をも企図している。

##### 【0002】

#### （発明の背景）

非ホジキンリンパ腫のB細胞サブタイプのようなB細胞リンパ腫は、癌死亡率に大いに寄与している。治療の様々な形態へのB細胞悪性腫瘍の応答は、混在している。例えば、非ホジキンリンパ腫の適切な臨床的ステージングが可能である場合、フィールド放射線治療は、満足のゆく治療を提供することが可能である。しかしまだ、このB細胞悪性腫瘍の病気で、およそ半分の患者が死亡する。Devesaら、J. Nat'l Cancer Inst. 79:701 (1987)。

##### 【0003】

慢性リンパ性白血病の殆どは、B細胞系腫瘍由来である。Freedman, Hematol, Oncol. Clin. North Am. 4:405 (1990)。このタイプのB細胞悪性腫瘍は、西洋においては最もありきたりな白血病である。Goodmanら、Leukemia及びLymphoma 22:1 (1996)。慢性リンパ性白血病の自然発達は、いくつかの段階に分かれる。初期の段階では、慢性リンパ性白血病は無痛性の病気で、寿命が長くなった小さな成熟した機能不全の悪性B細胞の蓄積によって特徴付けられる。

##### 【0004】

結局のところ、悪性B細胞の倍增時間が減少し、患者はますます症状を呈するようになる。治療が症状の緩和を提供することが可能である一方、全体の患者生

存率にはほとんど影響しない。慢性リンパ性白血病の最終段階は、顕著な貧血及び／又は血小板減少が特徴である。この時点で、平均生存期間は2年以下である。Foonら、Annals Int. Medicine 113:525 (1990)。細胞増殖速度が非常に遅いため慢性リンパ性白血病は、治療に抵抗性である。

#### 【0005】

化学治療及び放射線治療を含む伝統的なB細胞悪性腫瘍の治療方法は、毒性副作用があるために使用に制限がある。放射性核種、毒素、又はその他の治療剤を指向させるモノクローナル抗体の使用は、そのような剤が腫瘍部位に選択的に送達されうる可能性を提供するものであり、このようにして正常組織への毒性を制限することが可能となる。

#### 【0006】

CD20抗原に対する抗体はB細胞リンパ腫の治療のために研究されてきている。例えば、「IDEC-C2B8」と命名された抗CD20キメラ抗体は、非複合抗体として一回注射あたり500mgを超える量を反復注射すると、B細胞リンパ腫に対して活性を有する。Maloneyら、Blood 84:2457 (1994) ; Longo, Curr. Opin. Oncol. 8:353 (1996)。軽度で、無活動の形態を有し、この養生法で治療されたおよそ50パーセントの非ホジキン患者は、応答反応を示した。治療的応答は、また、<sup>131</sup>IラベルB1抗CD20マウスモノクローナル抗体を一回注射あたり600mgを超える量を反復投与された時にも得られた。Kaminskiら、N. Engl. J. Med. 329:459 (1993) ; Pressら、N. Engl. J. Med. 329:1219 (1993) ; Pressら、Lancet 346:336 (1995)。しかし、これらの抗体は、非複合体であろうと放射性ラベル化体であろうと、中間型又は急速進行型の、より優勢で致命的なB細胞リンパ腫の形態を有する患者には、目標とする応答を示さなかった。

#### 【0007】

B細胞悪性腫瘍にたいする、比較的抗体投与量の少ない反復投与を可能にする免疫治療法、又、有意な期間、治療的応答を達成するのに毒性剤を追加しないで

も併む免疫治療法を開発する必要性が存在する。

#### 【0008】

##### (発明の要約)

従って、本発明の目的は、比較的低用量の抗CD22抗体及び／又は抗CD19抗体の投与でB細胞悪性腫瘍を治療する方法を提供することにある。

#### 【0009】

本発明の更なる目的は、治療において、抗CD22抗体及び／又は抗CD19抗体の低用量が、免疫複合体又は抗体融合蛋白のような治療的蛋白の投与で補足され、或いはこれらの抗体が、化学療法的養生法により補足されるB細胞悪性腫瘍の治療に複合様式の治療法を提供することにある。

#### 【0010】

これらの、及び他の目的は、本発明の一実施例に従い、B細胞悪性腫瘍を有する被験者に抗CD22抗体及び薬学的に許容される担体を投与する段階から成るB細胞悪性腫瘍の治療法を提供することにより達成される。

#### 【0011】

##### 1. 概要

上述したように、抗CD20抗体は、複合体化していなくても放射性核種でラベル化していてもどちらでも、B細胞リンパ腫の中間的な又は急速進行性線癌の患者には目標とする応答反応を提供できていない。驚くことに、非ホジキンリンパ腫（不活動型および急速進行性線癌の間方）、又は、急性のリンパ性白血病を患っている患者での臨床上の研究は、比較的低用量（一回投与あたり、例えば、20～100mgの蛋白）の「EPB-2」又は、「LL-2」と称される非複合体のマウス又は、ヒト化抗CD22抗体の投与が、24ヶ月間持続する部分的または完全な寛解を誘導することが可能であることを証明した。このような患者が積極的な化学療法のコースを多数回した後、又は骨髄移植をした後ですら、しばしば再発するという事実にもかかわらず、上述したことが証明された。非複合体の又は放射性ラベルの抗CD20抗体では、特に低蛋白用量で、そのような効果が得られていなかったため、非複合体の抗CD22抗体を用いたこの肯定的な結果は、非ホジキンリンパ腫の急速進行性（中間的な）様態を有する進行



患者、並びに慢性及び急性リンパ性白血病においては驚くべきものである。さらに、抗CD22抗体でのこの肯定的な結果は、B細胞型の慢性リンパ性白血病は普通CD22を発現しないとするFreedman, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4:405 (1990) による言明からすると予期しないことである。

#### 【0012】

#### 2. 定義

以下の記述において、またそこで、参考文献により取り込んだ文書において多数の学術用語が広範囲に使用されている。本発明の理解を容易にするために以下のような定義が提供されている。

#### 【0013】

構造遺伝子はメッセンジャーRNA (mRNA) に転写されるDNA配列であり、mRNAは次に特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸配列に翻訳される。

#### 【0014】

プロモーターは構造遺伝子の転写を支配するDNA配列である。典型的には、プロモーターは遺伝子の5'領域に位置し、構造遺伝子の転写開始位置の近位にある。プロモーターが誘導型プロモーターの時には、誘発剤に呼応して転写速度が増大する。反対に、もしプロモーターが構成性プロモーターの時には、転写速度は誘発剤によって調節されることは無い。

#### 【0015】

単離DNA分子は生物のゲノムDNAに組み込まれていないDNAの断片である。例えば、クローン化された抗体遺伝子は哺乳動物細胞のゲノムDNAから分離されたDNA断片である。単離DNA分子のもう一つ別の例は化学的に合成されたDNA分子であり、これは生物のゲノムDNAに組み込まれていないものである。

#### 【0016】

エンハンサーは、転写開始位置に対するエンハンサーの距離や方位に関わらず、転写の効率を増大させることが出来るDNA調節要素である。

#### 【0017】

相補的DNA (cDNA) は逆転写酵素によりmRNA鋳型から作られる一本鎖DNA分子である。典型的には、mRNAの部分に相補的なプライマーが逆転写を開始するために使われる。当業者は、また、学術用語である「cDNA」をそのような一本鎖DNAとそれに相補的なDNA鎖からなる二重鎖DNA分子を引用するのに使用する。

【0018】

発現という用語は遺伝子産物の合成を意味する。例えば、構造遺伝子の場合には、発現は構造遺伝子のmRNAへの転写、およびmRNAから一つ又はそれ以上のポリペプチドへの翻訳を意味する。

【0019】

クローニングベクターは宿主細胞中で自律的に複製する能力を有するプラスミド、コスミド、或いはバクテリオファージのようなDNA分子である。クローニングベクターは、典型的には、一つ或いは少数の制限酵素認識部位を含んでおり、その部位に、クローニングベクターで形質転換した細胞の同定や選択に用いるのに適したマーカー遺伝子のみならず、外来のDNA配列をベクターの本質的な生物学的機能を損なうことなく確定的様式で挿入することが出来る。マーカー遺伝子は、典型的には、テトラサイクリン抵抗性、或いはアンピシリン抵抗性を供与する遺伝子を包含する。

【0020】

発現ベクターは宿主細胞中で発現される遺伝子からなるDNA分子である。典型的には、遺伝子発現は、構成性または誘導性プロモーター、組織特異的な調節要素、及びエンハンサーを含むある種の調節要素の制御下に置かれる。そのような遺伝子は調節要素に「挙動的にリンク (operably linked to)」していると言われている。

【0021】

組換え宿主はクローニングベクターまたは発現ベクターのいずれかを含むいかなる原核生物または真核生物であってもよい。この用語は、また、宿主細胞の染色体またはゲノム中にクローン化した遺伝子 (瓶) を含むように遺伝子操作された原核生物または真核生物を包含する。

#### 【0022】

抗体断片はF (a b')<sub>2</sub>, F (a b)<sub>2</sub>, Fab', Fabなどのような抗体の一部分である。構造によらず抗体断片は完全な抗体によって認識されるのと同じ抗原と結合する。例えば、抗CD22モノクローナル抗体断片はCD22のエピトープと結合する。

#### 【0023】

「抗体断片」という用語は、また、抗体のように特定の抗原と結合することによって複合体を形成するように作用する合成または遺伝子操作された蛋白のいかなるものをも包含する。例えば、抗体断片はL鎖可変領域からなる単離された断片、H鎖及びL鎖の可変領域からなる「Fv」断片、L鎖及びH鎖の可変領域をペプチドリンカーで繋げた組換え一本鎖ポリペプチド分子（「sfv蛋白」）及び超可変領域に似たアミノ酸残基からなる最小認識単位を包含する。

#### 【0024】

キメラ抗体は細菌類の抗体から導入された可変領域と相補性決定領域を含む組換え蛋白である。一方、抗体分子の残りの部分はヒト抗体から導かれる。

#### 【0025】

ヒト化抗体はネズミのモノクローナル抗体の相補性決定部位をネズミの免疫グロブリンのH、L可変鎖からヒトの可変領域に移し変えた組換え蛋白である。

#### 【0026】

ここで使用されるように、治療剤とは治療に有用である複合体を作るために抗体部分に複合体化される分子、又は原子である。治療剤の例は、薬剤、毒素、免疫調節剤、キレート化剤、ホウ素化合物、光活性剤又は色素、及び放射性同位元素を含む。

#### 【0027】

裸の抗体 (naked antibody) は、抗体断片に対立するものとして、抗体全体であり、裸の抗体は治療剤と複合体化していない。裸の抗体は、キメラ及びヒト化抗体のようなある種の組換え抗体のみならずポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を包含する。

#### 【0028】

抗体成分とは、ここで使用されるように、抗体全体、及び抗体断片の両方を包含する。

【0029】

免疫複合体は抗体成分の治療剤との複合体である。

【0030】

ここで使用されるように、抗体融合蛋白という用語は一つ又はそれ以上の成分及び治療剤からなる組換え分子のことを指す。そのような融合蛋白に適する治療剤の例は免疫調節剤（「抗体-免疫調節剤融合蛋白」）及び毒素（「抗体-毒素融合蛋白」）を含む。融合蛋白は単一の抗体成分、異なった抗体成分の多価の組み合わせ、又は同じ抗体成分の多量のコピーを包含する。

【0031】

3. 抗CD22及び抗CD19モノクローナル抗体、ヒト化抗体、霊長類抗体、及びヒト抗体の生産

CD22及びCD19に対する霊長類のモノクローナル抗体は当業者にとって良く知られた方法で入手することが出来る。一般的には、例えば、Kohler及びMilstein, Nature 256:495 (1975), 及びColiganら (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) [「Coligan」]である。簡潔に言うと、モノクローナル抗体は、マウスにCD22又はCD19からなる組成物を注射し、血清試料を取り出して抗体産生の存在を確かめ、Bリンパ球を得るために脾臓を摘出し、ハイブリドーマを作るためにBリンパ球をミエロマ細胞と融合させ、ハイブリドーマをクローニングし、抗CD22又は抗CD19抗体の産生陽性細胞を選択し、その抗原に対する抗体を産生するクローンを培養し、ハイブリドーマの培養液からその抗体を単離することによって得ることが出来る。

【0032】

モノクローナル抗体は種々の良く確立された技術によってハイブリドーマ培養液から単離、精製することが出来る。そのような単離の技術はProtein-

Aを使ったアフィニティー・クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーを含む。例えば、Coliganのページ2. 7. 1-2. 7. 12, 及びページ2. 9. 1-2. 9. 3を参照せよ。また、Bainesら、「Purification of Immunoglobulin G (IgG),」 in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Human Press, Inc. 1992)を参照せよ。

#### 【0033】

抗体産生のために使う良く特徴付けられたCD22又はCD19抗原の適切な量は標準化された技術を使って得ることが出来る。一例として、Tedderら、米国特許No. 5, 484, 892 (1996)に記載されている析出させた抗体を使ってBリンパ球蛋白からCD22を免疫沈殿させることが可能である。

#### 【0034】

もう一つ別の選択肢として、CD22又はCD19蛋白を過剰に産生する形質移入培養細胞からCD22蛋白又はCD19蛋白を得ることも可能である。CD22又はCD19をコードするDNA分子からなる発現ベクターは公表されたCD22及びCD19のヌクレオチド配列を使って構築することが可能である。例えば、Wilsonら、J. Exp. Med. 173:137 (1991); Wilsonら、J. Immunol. 150:5013 (1993)を参照せよ。引例として、CD22又はCD19をコードするDNA分子は、相互にブライミングする長鎖のオリゴヌクレオチドを使ってDNA分子を合成することが可能である。例えば、Ausubelら、(eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, pages 8.2. 8-8.2.13 (1990) [「Ausbel」]を参照せよ。また、Wosnickら、Gene 60:115 (1987); 及びAusubelら (eds.), SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 3rd Edition, pages 8-8 to 8-9 (John Wiley & Sons, Inc. 1995)も参照せよ。ポリメラーゼ連鎖反応を使用した確立された技術は長さが1.8キロベースもの大きな遺

伝子を合成する能力を提供することができます。Adangら、Plant Molec. Biol. 21:1131 (1993) :Bamborら、PCR Methods及びApplications 2:266 (1993) :Dillonら、「Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes,」 in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 15:PCR PROTOCOLS:CURRENT METHODS及びAPPLICATIONS, White (ed.), pages 263-268, (Humana Press, Inc. 1993)。

【0035】

この手法の変形として、抗CD22モノクローナル抗体、又は、抗CD19モノクローナル抗体はCD22cDNA又はCD19cDNAを安定的に形質移入したネズミのブレB細胞株で免疫したマウスから取り出した脾臓とミエローム細胞を細胞融合することによっても得ることが可能である。Tedderら、米国特許No. 5, 484, 892 (1996) を参照せよ。

【0036】

適切なマウスの抗CD22モノクローナル抗体の一つの例は、LL2 (以前のEPB-2) モノクローナル抗体であり、これは、Burkittリンパ腫に由来するヒトラジ細胞に対して作製された。Pawlak-Byczkowskaら、Cancer Res. 49:4568 (1989)。このモノクローナル抗体はIgG2<sub>a</sub>アイソタイプを有し、この抗体は、速やかに細胞の内部に取り込まれる。Shihら、Int. J. Cancer 56:538 (1994)。免疫染色法及び、インビボでの放射性免疫検出法による研究は、B細胞リンパ腫を検出する際にLL2の優れた感度を証明した。Pawlak-Byczkowskaら、Cancer Res. 49:4568 (1989) :Murthyら、Eur. J. Nucl. Med. 19:394 (1992)。更に、<sup>99m</sup>Tcラベル化LL2-Fab' 断片は、B細胞リンパ腫のアップステージングをフローするのに有用であることが証明された。一方、<sup>131</sup>Iラベル化完全型L

L2及びLL2 F(ab')<sub>2</sub>断片はリンパ腫部位を標的にしたり、治療的応答を誘導するのに用いられてきた。Murthyら、Eur. J. Nucl. Med. 19:394 (1992); Millsら、Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 34:479 (1993) [Abstract 2857]; Baumら、Cancer 73 (Suppl. 3):896 (1994); Goldenbergら、J. Clin. Oncol. 9:548 (1991)。更に、シェードモナス菌体外毒素の誘導体と複合化したFab' LL2断片は、ヌードマウスで成長する測定可能なヒトリンパ腫異種移植片を完全寛解に導くことが示された。Kreitmanら、Cancer Res. 53:819 (1993)。

#### 【0037】

更なる実施形態では、本発明の抗体は、ヒト抗体の変領域が髄鞘の抗CD22又は抗CD19抗体の変領域により置換されているキメラの抗体である。キメラ抗体の利点は、免疫原性が減ること、及びインビボでの安定性が増大することを含む。

#### 【0038】

キメラの抗体を構成する技術は、当業者に公知である。一例として、Leungら、Hybridoma 13:469 (1994)は、それぞれヒトκ及びIgG<sub>1</sub>定常領域を、LL2モノクローナル抗体のV<sub>K</sub>及びV<sub>H</sub>領域をコードするDNA配列と組み合わせることにより、LL2キメラを作製する方法を説明している。この刊行物は又、LL2のL鎖及びH鎖可変領域、それぞれV<sub>K</sub>及びV<sub>H</sub>のヌクレオチド配列も提供している。

#### 【0039】

また別の実施形態では、本発明の抗体は人間に近い霊長類抗体である。ヒヒにおける治療的に有用な抗体を誘起する一般的な技術を、例えば、Goldenbergら、国際特許公報No. WO91/11465 (1991)、及びLismanら、Int. J. Cancer 46:310 (1990)に見ることも可能である。

#### 【0040】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体は「ヒト化」モノクローナル抗体である。つまり、マウス相補性決定領域は、マウス免疫グロブリンのH可変鎖及びL可変鎖からヒトの可変領域に移し換え、続いてフレームワーク領域にあるヒトの残基をいくつかそれらマウスの相対物に置き換える。本発明によるヒト化したモノクローナル抗体は、治療的方法に用いることに適している。マウスの免疫グロブリンをクローニングする一般的な技術は、例えば、Orlandiら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833 (1989)の刊行物に説明されている。ヒト化したモノクローナル抗体を作製する技術は、例えば、Jonesら、Nature 321:522 (1986)、Riechmannら、Nature 332:323 (1988)、Verhoevenら、Science 239:1534 (1988)、Carterら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)、Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437 (1992)、及びSingerら、J. Immun. 150:2844 (1993)により説明されている。Leungら、Mol. Immunol. 32:1413 (1995)の刊行物はヒト化したLL2抗体の構築を説明している。

#### 【0041】

別の実施形態では、本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このような抗体は、抗原チャレンジにตอบสนองして、特定のヒト抗体を作製するために、「人工改変した」トランスジェニックマウスから得られる。この技術では、ヒトH鎖及びL鎖部位の要素が、内生のH鎖及びL鎖部位を標的にして欠失させた胚幹細胞株から導かれたマウスの系統に導入される。トランスジェニックマウスは、ヒト抗原に特異的なヒト抗体を合成することが可能であり、又、そのマウスをヒト抗体分泌性のハイブリドーマを作製するのに用いることも可能である。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、Greenら、Nature Genet. 7:13 (1994)、Lonbergら、Nature 368:856 (1994)及びTaylorら、Int. Immun. 6:579 (1994)により説明されている。

#### 【0042】



#### 4. 抗体断片の生産

本発明は、抗CD22抗体及びCD19抗体又は、別の治療的に有用な抗体の断片を用いることを企図している。抗体の断片は、抗体の蛋白質加水分解、又は、断片をコードするDNAをE. coliで発現させることにより調製することが可能である。

##### 【0043】

抗体の断片は、従来の方法により、抗体全体のペプシン又はババイン消化によって得ることが可能である。例えば、抗体をペプシンで酵素的に開裂することにより抗体断片を作製して、 $F(ab')_2$  命名された5S断片を供与することが可能である。この断片を更に、チオール還元剤及び、ジスルフィド結合の開裂の結果生じるスルフィドリル基の保護基を随意に用いて開裂し、3.5S Fab' 一価断片を作製することが可能である。別の選択肢として、ペプシンを用いる酵素開裂では、2つの一価Fab断片及びFc断片が直接に生成する。これらの方法は、例えばGoldenberg, 米国特許No. 4,036,945及び4,331,647並びにそれらに記載の参照文献に説明されている。又、Nisonoffら, Arch Biochem. Biophys. 89:230 (1960); Porter, Biochem. J. 73:119 (1959), Edelmanら, in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422 (Academic Press 1967)並びに, Coliganのページ 2.8.1-2.8.10及び2.10-2.10.4も参照のこと。断片が完全抗体により認識される抗原に結合する限り、H鎖を分離して一価L-H鎖断片を作製したり、更なる断片の開裂、或いは別の酵素的、化学的、遺伝子的技術のような抗体開裂のための他の方法を用いてもよい。

##### 【0044】

例えば、Fv断片は、 $V_H$ 鎖 $V_L$ 鎖の会合から成る。この会合はInbarら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659 (1972)に記載されているように非共有結合でありえる。また一方、その可変鎖は分子間ジスルフィド結合により架橋し得るし、又は、グルタルアルデヒドのような化

学物質により架橋結合することが可能である。例えば、上記の Sandhu を参照のこと。

#### 【0045】

その Fv 断片はペプチドリンカーにより連結する V<sub>H</sub> 鎖と V<sub>L</sub> 鎖から成ることが好ましい。これらの単鎖抗原結合蛋白 (sFV) は、オリゴヌクレオチドにより連結される V<sub>H</sub> 領域と V<sub>L</sub> 領域をコードする DNA 配列から成る構造的遺伝子を構成することにより調製される。構造的遺伝子を発現ベクターに組み込み、続いて E. coli のような宿主細胞に導入する。組み替え宿主細胞は、2つの V 領域を橋渡しするリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖を合成する。sFv を生産する方法は、例えば、Whitlow ら、Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991) により説明されている。また、Bird ら、Science 242:423 (1988)、Ladner ら、米国特許 No. 4,946,778、Pack ら、Bio/Technology 11:1271 (1993)、及び上記の Sandhu も又参照のこと。

#### 【0046】

抗体断片の別の形態は、単一の相補性決定部位 (CDR) をコードするペプチドである。CDR ペプチド (「最小認識単位」) は、関与する抗体の CDR をコードする遺伝子を構築することにより得ることが可能である。このような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞の RNA から可変領域を合成するのにポリメラーゼ連鎖反応を使って調製される。例えば、Larrick ら、Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106 (1991)、Courtenay-Luck, 「Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies」, in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING 及び CLINICAL APPLICATION, Ritter ら (eds.), pages 166-179 (Cambridge University Press 1995) と Ward ら, 「Genetic Manipulation 及び Expression of Ant

ibodies, J in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES及びAPPLICATIONS, Birchら、(eds.), pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照のこと。

#### 【0047】

##### 5. 免疫複合体の調製

本発明は、B細胞悪性腫瘍の治療効果を得るために免疫複合体を用いるのと同様に、「裸の」抗CD22抗体及び抗CD19抗体を用いることを企図している。このような免疫複合体は抗体成分に治療剤を間接的に複合体化することにより調製することが可能である。一般的な技術は、Shihら、Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shihら、Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); 及び、Shihら、米国特許No. 5,057,313に説明されている。この一般的な技術は、酸化された炭水化物部分を有する抗体成分を、少なくとも1つの遊離アミノ官能基を有し、複数の薬剤、毒素、キレート化剤、ホウ素付加物、又はその他の治療剤を負荷した担体ポリマーと反応させることを含んでいる。この反応は、まず、Schiff塩基(イミン)結合を生じるが、このSchiff塩基(イミン)結合は、第二級アミンに還元されて安定化し、最終複合体を形成することが可能である。

#### 【0048】

担体ポリマーは、アミノデキストランか、又は少なくとも50アミノ酸残基からなるポリペプチドであることが好ましいが、その他の本質的に等価であるポリマー担体も又用いることが可能である。最終免疫複合体は、投与を容易にしたり、治療用の効果的な標的化のために哺乳動物の血清のような水溶液に溶解することが好ましい。担体ポリマー上の可溶性官能基は、このようにして最終免疫複合体の血清溶解度を向上させるであろう。特に、アミノデキストランが好ましい。

#### 【0049】

アミノデキストラン担体を用いて免疫複合体を調製する過程は、典型的にはデキストランポリマー、利便性上、およそ10,000~100,000の平均分子量のデキストランで始まる。このデキストランを、酸化剤と反応させ、その炭

水化物環の一部分の制御的な酸化で、効果的にアルデヒド基を発生させる。この酸化は従来の手順によって、 $\text{NaIO}_4$ のようなグリコール開裂作用のある化学試薬で便宜的に効果的に行う。

#### 【0050】

酸化されたデキストランはその後、ポリアミン、好ましくは、ジアミンと、更に好ましくは、モノ又はポリヒドロキシジアミンと反応を起こさせる。適切なアミンは、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、或いはポリメチレンジアミンのようなジアミンジエチレントリアミン、又はポリアミンのようなアミン、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン、或いは、他のヒドロキシル化ジアミン又はポリアミンのようなアミン等を含む。アルデヒド官能基をSchiff塩基グループにほぼ完全に変換することを確実にするためにデキストランのアルデヒド基に比して過剰のアミンが用いられる。

#### 【0051】

$\text{NaBH}_4$ 、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ などのような還元剤を、合成Schiff塩基中間体の還元的安定化に効果的に用いられる。合成された付加物は、通常のサイジンググラムを通過で精製し架橋結合したデキストランを取り除くことが可能である。

#### 【0052】

デキストランを誘導体化してアミン官能基を導入する別の従来の方法、例えば、プロモシアンとの反応の後にジアミンと反応させる方法もまた用いることが可能である。

#### 【0053】

アミノデキストランは、次に活性型の、好ましくは、従来の手段、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)又はその水溶性変体を用いる手段によりカルボキシル基が活性化された誘導体の形にした負荷しようとする特定の薬剤、毒素、キレート化剤、免疫調節剤、ホウ素付加物又は、他の治療剤の誘導体と反応し、中間付加体を形成する。

#### 【0054】

また別の選択肢として、アメリカマゴボウの抗ウイルス蛋白、又はリシンA

一鎖などのようなポリペプチド毒素をグルタルアルデヒド縮合によって、アミノデキストランに結合させることも可能であるし、また、その蛋白の活性化したカルボキシル基をアミノデキストランのアミンと反応させて結合させることも可能である。

【0055】

放射性金属又は磁気共鳴エンハンサーのためのキレート化剤は、当分野では公知である。典型的なもの、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）及びジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）の誘導剤である。これらのキレート化剤は、一般に側鎖上に基を有しており、それより、キレート化剤を担体に付けることが可能である。この様な基は、例えばベンジルイソチオシアネートを含み、それにより、DTPA又はEDTAを担体のアミン基に結合させることが可能である。又別の選択肢として、キレート化剤上のカルボキシル基又はアミン基を、活性化又は前もっての誘導体化、その後の結合により、全て既知の手段で担体に結合させることが可能である。

【0056】

カルボランのようなホウ素付加物を従来の方法で抗体成分に付けることが可能である。例えば、カルボランは、当分野において既知であるように、ぶら下がりが側鎖にカルボキシル基官能基をもって、調製されることが可能である。担体、例えば、アミノデキストランのような担体にカルボランを取り付けることは、カルボランのカルボキシル基の活性化と担体上のアミンとの縮合により達成され、中間複合体を作製することが可能である。このような中間複合体は、次に抗体成分に付けられ、以下に説明するように、治療的に有用な免疫複合体を作製することが可能である。

【0057】

ポリペプチド担体を、アミノデキストランの代わりに用いることが可能であるが、ポリペプチド担体は、少なくとも50のアミノ酸残基を、好ましくは、100-5000のアミノ酸残基を鎖上に有しなければならない。少なくともいくつかのアミノ酸は、リジン残基又はグルタミン酸残基又はアスパラギン酸残基でなければならない。リジン残基のぶら下がりがアミン、並びにグルタミン酸及びアス

パラギン酸のぶら下がりカルボキシル基は、薬剤、毒素、免疫調節剤、キレート剤、ホウ素付加物又は、他の治療剤を付けるのに都合がよい。適切なポリペプチド担体の例は、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、その重合体並びに、これらのアミノ酸とその他、例えば、セリン、の混合ポリマーを含み、合成される負荷担体及び免疫複合体に所望の溶解性質を付与する。

#### 【0058】

抗体成分と中間複合体との結合は、抗体成分の炭水化物部分を酸化することにより、そして生成したアルデヒド(ケトン)のカルボニルを、薬剤、毒素、キレート剤、免疫調節剤、ホウ素付加物又は、他の治療剤で負荷した後に担体上に残留しているアミノ基と反応させることにより効果的に行われる。又別の選択肢として、中間複合体は、治療剤を負荷した後に中間複合体に導入されていたアミノ基を介して、酸化された抗体成分に付けることが可能である。酸化は、例えば、 $\text{NaIO}_4$ 又は別の解裂作用のある試薬を使って化学的に、又は、例えば、ノイラミニターゼ、及びガラクトースオキシターゼを使って酵素的に、のいずれかによって便宜的に達成される。アミノデキストラン担体の場合、アミノデキストランの全てのアミンが、治療剤を負荷するのに使われるわけではない。アミノデキストランの残留アミンは、酸化された抗体成分と縮合し、Schiff塩基付加体を形成する。その後、このSchiff塩基付加体は還元的に、通常ボロハイドライド還元剤を用いて安定化される。

#### 【0059】

本発明に従って、類似した手順を用いて別の免疫調節剤を作製する。負荷されたポリペプチド担体は、抗体成分の酸化された炭水化物部分との縮合のために残留している遊離リジン残基を有するのが好ましい。ポリペプチド担体上にあるカルボキシル基は、必要な場合に、例えば、DCCで活性化し、ジアミンの過剰量との反応によりアミンに変換することが可能である。

#### 【0060】

最終の免疫複合体は、Sephacryl S-300でのゲル濾過クロマトグラフィーのような従来の技術を用いて精製される。

#### 【0061】

或いは又、免疫複合体を、直接に抗体成分を治療剤に複合体化して調製することが可能である。一般の手順は、治療剤を直接に酸化された抗体成分に付けることを除いて間接的な複合体化の方法に類似している。

【0062】

別の治療剤をここで説明したキレート化剤に代用できることは十分認識されるであろう。当業者は、実験することなく複合体化のスキームを工夫することが可能である。

【0063】

更なる例証として、治療剤はジスルフィド結合形成を介して還元された抗体成分のヒンジ領域に付けることが可能である。例えば、破傷風毒素ペプチドは、抗体成分にペプチドを付けるのに用いられる唯一のシステイン残基を用いて構築することが可能である。別の選択肢として、このようなペプチドは、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 (SPDP) のような異種二官能性架橋剤を用いて、抗体成分に付けることが可能である。Yuら, Int. J. Cancer 56:244 (1994)。この様な複合体化にたいする一般的な技術は、その技術において既知である。例えば、Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION及びCROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslacisら, Modification of Antibodies by Chemical Methods, J in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES及びAPPLICATIONS, Berchら (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); 及びPrice, 「Production及びCharacterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」 in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING及びCLINICAL APPLICATION, Ritterら (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995) を参照のこと。

【0064】

上述したように、抗体のFc領域にある炭水化物部分は、治療剤を複合体化するのに用いることが可能である。しかし、もし抗体断片が免疫複合体の抗体成分として用いられる場合、Fc領域はない。しかし、炭水化物部分を抗体又は抗体断片のL鎖可変領域に導入することは、可能である。例えば、Leungら、J. Immunol. 154:5919 (1995)；及びHansenら、米国特許No. 5,443,953 (1995)を参照のこと。技術的に作られた炭水化物部分は、その後、治療剤を付けるのに用いられる。

#### 【0065】

更に、当業者は複合体化方法の数多くの可能な変形を認識するであろう。例えば、炭水化物部分は、完全抗体又はその抗原結合断片の血液、リンパ液、又はその他の細胞外液中での半減期を延長させるために、ポリエチレングリコールを付けるのに用いられることが可能である。さらに、治療剤を炭水化物部分及び遊離スルフィドリル基に付けることで「二価の免疫複合体」を構築することが可能である。この様な遊離フルヒドリル基は抗体成分のヒンジ部位にあってもよい。

#### 【0066】

##### 6. 融合蛋白の調製

本発明は、一つ又はそれ以上の抗体部分及び免疫調節剤又は毒素部分から成る融合蛋白を用いることを企図している。有用な抗体部分は、CD19、CD20、CD22、CD52又はCD74を結合する抗体成分を含有し、融合蛋白は、これらの抗体型の一、二、三、四、又は五つ全ての型から成ってもよい。本発明に応じて、二価、三価、四価、及び五価の構成物を用いることが可能である。

#### 【0067】

抗体-免疫調節剤融合蛋白を作る方法は、当業者に知られている。例えば、インターロイキン-2部分から成る抗体融合蛋白は、Bolettiら、Ann. Oncol. 6:945 (1995)、Nicolettiら、Cancer Gene Ther. 2:161 (1995)、Beckerら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996)、Hankら、Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996)、及びHuら、Cancer Res. 56:4998 (1996)により説明されている。更に、



Yangら、Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995) は、F(ab')<sub>2</sub> 断片及び腫瘍壊死因子アルファ部分を含有する融合蛋白を記している。さらに、hLL2-1L-2 融合蛋白の治療的使用は、本発明の適用の実施例5で説明されている。

#### 【0068】

抗体毒素融合蛋白中の組み替え分子が、一つ又はそれ以上の抗体成分及び毒素又は化学療法剤から成る抗体-毒素融合蛋白を作る方法は、又当業者に知られている。例えば、抗体-シュードモナス外毒素A融合蛋白は、Chaudharyら、Nature 339:394 (1989)、Brinkmannら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991)、Batraら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992)、Friedmanら、J. Immunol. 150:3054 (1993)、Welsら、Int. J. Can. 60:137 (1995)、Fominayara、J. Biol. Chem. 271:10560 (1996)、Kuanら、Biochemistry 35:2872 (1996)、及び、Schmidtら、Int. J. Can. 65:538 (1996)で説明されている。ジフテリア毒素部分を含有する抗体-毒素融合蛋白は、Kreitmanら、Leukemia 7:553 (1993)、Nichollsら、J. Biol. Chem. 268:5302 (1993)、Thompsonら、J. Biol. Chem. 270:28037 (1995)、及び、Valleiraら、Blood 88:2342 (1996)で説明されている。Deonaraiaら、Tumor Targeting 1:177 (1995)は、RNase部分を有する抗体-毒素融合蛋白を記述している。一方、Linaudouら、Cell Biophys. 24-25:243 (1994)は、DNase I 成分から成る抗体-毒素融合蛋白を作製した。グロニンは、Wangら、Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, CA, 2-6 April, 1995, Part 1, BIOT005 の抗体-毒素融合蛋白中の毒素部分として用いられた。更なる例として、Dohlstenら、Proc. Nat'l

Acad. Sci. USA 91:8945 (1994) は、Staphylococcus 腸毒素-A から成る抗体-毒素融合蛋白を報告した、

【0069】

このような複合体の調製に適切に用いられた毒素の例は、リシン、アブリン、リボスクレアーゼ、DNase I、Staphylococcus 腸毒素-A、アメリカヤマガボウ抗ウイルス蛋白、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、及び、シュードモナス内毒素である。例えば、Pastan ら、Cell 47:641 (1986) 及び、Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994) を参照のこと。別の適切な毒素は、当業者に知られている。

【0070】

7. 抗体、免疫複合体、及び融合蛋白の脂質エマルジョンへの結合  
ポリ（エチレングリコール）で修飾されたフォスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を用いて安定化された長循環のスブミクロン脂質エマルジョンは、本発明の抗CD22及び抗CD19抗体成分、免疫複合体、並びに融合蛋白のための薬剤担体として用いることが可能である。エマルジョンは、二つの主要部分から成っている。例えば、リン脂質のような乳化剤で安定化されたトリグリセリドのような油中子である。貧弱なリン脂質の乳化性質を、ポリソルベート80のような生物学的適合性のある共乳化剤を添加することにより、高めることが可能である。好適実施形態では、抗CD22抗体成分、及び抗CD19抗体成分、免疫複合体、並びに融合蛋白は、ポリ（エチレングリコール）を基礎とした異種二官能性結合剤、ポリ（エチレングリコール）-ビニルスルフォン-N-ヒドロキシスチンイミジルエステル（NHS-PEG-VS）を用いて質エマルジョン小球体の表面に複合体化される。

【0071】

サブミクロンの脂質エマルジョンは、説明したように調製され特徴づけられる。Lundberg, J. PharmSci., 83:72 (1993); Lundberg ら、Int. J. Pharm., 134:119 (1996)。脂質エマルジョンの基本的な組成は、トリオレイン:DPPC:ポリソルベート8

0, 2 : 1 : 0.4 (w/w) である。指示があれば、PEG-DPPE が脂質混合物に DPPE 換算で 2~8 mol % の量で添加される。

#### 【0072】

結合手順は、NHS-PEG-VS の NHS エステル基をジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン (DSPE) のアミノ基と反応させることで始まる。25  $\mu\text{mol}$  の NHS-PEG-VS を、1 ml のクロロホルムの中で 40℃ で 6 時間、23  $\mu\text{mol}$  の DPPE と 50  $\mu\text{mol}$  のトリエチルアミンと反応させて、ポリエチレングリコール鎖 (DSPE-PEG-VS) の遊離末端にビニルスルホン基を有するフォスファチジルエタノールアミンのポリエチレングリコール誘導体が生産する。抗体複合体化のために、DSPE-PEG-VS は、2 mol % の DPPC で脂質エマルジョン中に含まれる。この成分を、-20℃での貯蔵溶液からバイアルに分配し、溶剤を減圧下で蒸発乾燥する。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が添加され、この混合物は、50℃に加熱され、30 秒間ボルテックス攪拌され、1 分間、MSE ブローブ超音波破砕機でソニケーションされる。エマルジョンは、4℃で貯蔵され、24 時間以内に複合体化のために用いられるのが好ましい。

#### 【0073】

抗 CD22 抗体又は抗 CD19 抗体のエマルジョン小球体への結合は、小球体の表面上の遊離 PEG 末端にあるビニルスルホン基と抗体上の遊離チオール基との間での反応を介して行われる。ビニルスルホンは、チオール基への選択的なカップリングに魅力的な誘導体である。およそ中性の pH で、VS は、チオール基を含有する蛋白に 15~20 分の半減期で結合するであろう。VS の反応性は、マレイミドより僅かに劣るが、VS 基は、水中でより安定であり、チオール基との反応から安定な結合が生成される。

#### 【0074】

複合体化の前に、抗体は、0.2 M トリス緩衝液 (pH 8.7) の中で 4℃で 10 分間、50 mM 2-メルカプトエタノールにより還元される。還元された抗体は、50 mM 酢酸ナトリウムで緩衝化した 0.9% 生理食塩水 (pH 5.3) で平衡化した Sephadex G-25 スピニングカラムで過剰の 2-メルカプト

エタノールから分離される。この製品は、280nmで、その吸光度を測定（及び1mg/mlの抗体溶液が1.4と仮定して）することにより、又は<sup>125</sup>Iーラベル化した抗体の定量により蛋白濃度がアッセイされる。チオール基は、Aldrich（登録商標）を用いて343nmでの吸光度における変化及び標準としてシステインを用いて、決定される。

#### 【0075】

結合反応は、アルゴン下、周囲温度で一晩HEPES緩衝化生理食塩水（pH 7.4）の中で行われる。過剰のビニルスルホン基を、30分間2mMの2-メルカプトエタノールで消滅させ、過剰の2-メルカプトエタノール及び抗体は、Sephacrose CL-48カラムでのゲルクロマトグラフィーにより取り除かれる。免疫複合体は、カラムのボイドボリューム近くで集められ、0.45μm滅菌フィルタを通過することにより滅菌され、4℃で貯蔵される。

#### 【0076】

結合の効率は、<sup>125</sup>Iーラベル化した抗体を用いて算出される。エマルジョンの回収率は、平行する実験での [<sup>14</sup>C] DPPC の測定から推定される。表面を接合させたDSPE-PEG-VSのVS基への還元LL2の複合体化は、典型的効率がほぼ85%でかなり再現可能である。

#### 【0077】

8. 単純及び多様性養生法での抗CD22抗体及び抗CD22抗体の治療的使用

本発明は、裸の抗CD22抗体及び抗CD19抗体、又は抗CD22抗体及び抗CD19抗体から成る免疫複合体、或いは融合蛋白の使用を、B細胞悪性腫瘍の治療のために一次的治療組成物として用いることを企図している。このような組成物はボリクロナル抗CD22抗体又は抗CD19抗体、或いはモノクロナル抗CD22抗体又は抗CD19抗体を含むことが可能である。

#### 【0078】

更に、本発明の治療組成は、いくつかの異なったブロックされていないCD22エピトープに向けられたモノクロナル抗CD22抗体の混合物又は、いくつかの異なったブロックされていないCD19エピトープに向けられたモノクロナ

ール抗CD19抗体の混合物を含有することが可能である。モノクロナール抗体の交叉阻害研究は、エпитープA-Eと命名された五つのエпитープをCD22上に同定した。例えば、Schwartz-Albiezら、「The Carbohydrate Moiety of the CD22 Antigen Can Be Modulated by Inhibitors of the Glycosylation Pathway,」 in LEUKOCYTE TYPING IV. WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Knappら (eds.), p. 65 (Oxford University Press 1989)を参照のこと。例として、LL2抗体はエпитープBと結合する。Steinら、Cancer Immunol. Immunother. 37:293 (1993)。つまり、本発明は、少なくとも二つのCD22エпитープに結合するモノクロナール抗CD22抗体の混合物から成る治療的組成を企図している。例えば、このような混合物は、エпитープA、エпитープB、エпитープC、エпитープD及びエпитープEから成るグループから選択された少なくとも二つのCD22エпитープと結合するモノクロナール抗体を含むことが可能である。同様に、本発明は、少なくとも二つのCD19エпитープを結合するモノクロナール抗CD19抗体の混合物から成る治療的組成を企図している。

#### 【0079】

抗CD22抗体の結合特異性を決定する方法は、当業者には公知である。一般的な方法は、例えば、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOLUME 10: IMMUNOCHEMICAL PROTOCOLS, Mason (ed.) pages 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992)に記載のMoleによる「Epitope Mapping」により供与されている。更に具体的には、CD22エпитープ特異性を決定する結抗的プロッキングアッセイは、Steinら、Cancer Immunol. Immunother. 37:293 (1993), 及びT edderら、米国特許No. 5, 484, 892 (1996)により説明されている。

#### 【0080】

Tedder 特許は、一つ又はそれ以上の免疫グロブリン様領域を欠失するCD22変異体の作製も又説明している。これらの変異蛋白は、免疫グロブリン様領域1、2、3及び4がエпитープA、D、B及びCそれぞれに対応することを決定するのに用いられた。このようにして、CD22のエピトープ特異性は、試験抗体を特定の免疫グロブリン様領域を欠失する一連のCD22蛋白の結合により同定することもまた可能である。

#### 【0081】

裸の抗CD22抗体又は抗CD19抗体は、B細胞悪性腫瘍の第一の治療組成であるが、このような抗体治療の有効性は、裸の抗体をここに記載の免疫複合体、融合蛋白および別の補助的治療を補うことにより、高められることが可能である。このような多様式養生法では、補助的な治療組成物は、裸の抗CD22抗体又は抗CD19抗体を投与する前又は同時又は後に投与されることが可能である。

#### 【0082】

ここに記載の治療的組成物は、無痛性のB細胞リンパ腫、急速進行性のB細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病及び急性リンパ性白血病の治療に特に有益である。例えば、抗CD22抗体成分及び免疫複合体は、非ホジキンリンパ腫の無痛型と急速進行型との両方を治療するのに用いることが可能である。

#### 【0083】

放射性ラベル化した抗体、免疫複合体又は融合蛋白は、 $\alpha$ -放射の放射性同位元素、 $\beta$ -放射の放射性同位元素、 $\gamma$ -放射の放射性同位元素、Auger電子エミッター、 $\alpha$ -粒子を放射する中性子捕捉剤、又は電子の捕捉により衰退する放射性同位元素から成ってもよい。適切な放射性同位元素は、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{25}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{211}\text{Ar}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ などを含む。

#### 【0084】

上述したように、放射性同位元素は、キレート化剤を介して抗体成分に直接又は間接に付けることが可能である。例えば、 $^{67}\text{Cu}$ は半減期が61.5時間であ

ると、ベータ粒子及びガンマ線が豊富ことから、放射線免疫治療用のより有望な放射性同位元素の一つと考えられている<sup>67</sup>Cuは、キレート化剤、パラブロモアセトアミドベンジル-テトラエチルアミン四酢酸 (TEA) を使って複合体化されることが可能である。Medical Applications of Radioisotopes, J in 「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, Gennaro (eds.), pages 624-652 (Mack Publishing Co. 1990) を調べて下さい。又、<sup>90</sup>Yは、活発なベータ粒子を発生するが、この<sup>90</sup>Yは、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) を用いて抗体成分に結合することが可能である。更に、<sup>131</sup>Iで抗体成分を直接放射性ラベル化のための方法は、Steinら、Antibody Immunocnj. Radiopharm. 4: 703 (1991) により説明されている。

#### 【0085】

また、カルボランのようなホウ素付加物は、上述したように抗体成分に付けることが可能である。

#### 【0086】

好ましい免疫複合体及び融合蛋白は、抗体成分並びに、抗CD22抗体成分又は抗CD19抗体成分と免疫調節剤の複合体を含有する。ここに用いられているように、「免疫調節剤」の用語は、サイトカイン、幹細胞成長因子、腫瘍壊死因子 (TNF) のようなリンフォトキシン、及びインターロイキン (例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、及びIL-12) のような造血因子、コロニー刺激因子 (例えば、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 及び、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターフェロン (例えば、インターフェロン-α、-β、及び、-γ)、「S1因子」と命名された幹細胞成長因子、エリスロポイエチン及びトロポポイエチンを含む。適切な免疫調節剤部分の例には、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、インターフェロン-γ、TNF-α、などを含む。又、被験者は、裸の抗CD22抗体又は裸の抗CD19抗体、並びに別途投与されるサイトカインの投与を受け、このサイトカインは、裸の抗CD22抗体又は

裸の抗CD19抗体の投与の前、同時又は後に投与されることが可能である。サイトカインは、ヒトIgG1抗体のFc領域、hIL2に存在する領域、に結合することにより、腫瘍細胞を殺す効果のあるエフェクター細胞、ADCC/NK、の活性化を高める。

【0087】

抗体-免疫調節剤免疫複合体及び抗体-免疫調節剤融合蛋白は、免疫複合体を標的細胞に送達する手段を提供し、腫瘍細胞にたいして特に有用である。免疫調節剤のサイトカイン効果は、当業者には公知である。例えば、Klegermanら、「Lymphokines及びMonokines, in BIOTECHNOLOGY及びPHARMACY, Pessutoら(eds.), pages 53-70 (Chapman & Hall 1993)を参照のこと。例として、インターフェロンは、種々の細胞表面上にあるクラスI組織適合性抗原の発現の増大を誘起することにより、細胞の増殖を阻害することが可能であり、従って、細胞障害性Tリンパ球による細胞の破壊率を高めることが可能である。更に又、TNF- $\alpha$ のような腫瘍壊死因子は、DNA断片化を誘発することにより細胞障害性効果を生じると考えられている。

【0088】

免疫複合体及び融合蛋白の調製のための有益な癌化学療法剤は、ナイトロジェンマスタード、アルキルスルフォネート、ニトロソウレア、トリアゼン、葉酸類縁体、ピリミジン類縁体、プリン類縁体、抗生物質、エポドフィロトキシン、白金配位錯体、ホルモンなどを含む。適切な化学療法剤は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995) 及び、GOODMAN及びGILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985) に説明されている。実験的薬剤のような他の適切な化学療法剤は当業者に既知である。

【0089】

更に、治療的に有用な免疫複合体は、光活性剤又は色素を抗体複合物に結合さ



せることにより得ることが可能である。可視光に感受性のポルフィリンのような蛍光体及び他の色原体又は色素は、病巣に適切な光を当てることにより、病巣を検出したり治療したりするのに用いられてきている。治療では、これは光照射、光線治療、又は光力学治療 (Jorrie (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS及OTHER DISEASES (Libreria Progetto 1985): van den Bergh, Chem. Britain 22:430 (1986) と称されている。さらに、モノクローナル抗体は、光線治療を達成するために、光活性化色素と結合させられた。Mewら, J. Immunol. 130:1473 (1983) : 同著者による, Cancer Res. 45:4380 (1985) : Oseroffら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83:8744 (1986) : 同著者による Photochem. Photobiol. 46:83 (1987) : Hasanら, Prog. Clin. Biol. Res. 288:471 (1989) : Tatsutaら, Lasers Surg. Med. 9:422 (1989) : Pelegrinら, Cancer 67:2529 (1991)。しかし、これらの初期の研究は、内視鏡治療応用、特に抗体の断片又は亜断片の使用、を含まなかった。従って、本発明は、光活性剤又は色素から成る免疫複体の治療的使用を企図している。本発明の多様な治療法は、更に裸の抗体形体で又は免疫複体として、抗CD20抗体、抗CD52及び／又は抗CD74抗体の同時投与のみならず、抗CD19抗体及び抗CD22抗体それぞれの投与で補充される裸の抗CD22抗体及び裸の抗CD19抗体での免疫治療を含む。抗CD19抗体及び抗CD20抗体は、当業者に公知である。例えば、Ghetieら, Cancer Res. 48:2610 (1988) : Hekmanら, Cancer Immunol. Immunother. 32:364 (1991) : Kaminskiら, N. Engl. J. Med. 329:459 (1993) : Pressら, N. Engl. J. Med. 329:1219 (1993) : Maloneyら, Blood 84:2457 (1994) : Pressら, Lancet 346:336 (1995) : Longo, Curr. Opin. Oncol. 8:353 (1996) を参照のこと。

#### 【0090】

別の多様な治療では、被験者は、裸の抗CD22抗体又は裸のCD19抗体、及び／又は免疫複合体或いは融合蛋白を、標準的な癌化学療法とともに、投与される。例えば、「CVB」( $1.5\text{ g/m}^2$ シクロフオスファミド、 $200\sim400\text{ mg/m}^2$ エトポシド、及び $150\sim200\text{ mg/m}^2$ カルムスチン)は、非ホジキンリンパ腫を治療するために用いられる養生法である。Pattira, E. ur, J. Haematol. 51:18 (1993)。他の適切な組み合わせ化学療法的養生法は、当業者には公知である。例えば、Freedmanら、「Non-Hodgkin's Lymphomas」, in CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3rd Edition, Holland (eds.), pages 2028-2068 (Lea及びFebiger 1993)を参照のこと。例として、中間グレードの非ホジキンリンパ腫を治療するための第一世代の化学療法的養生法は、C-MOPP (シクロフオスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、及びブレドニゾン)及び、CHOP (シクロフオスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びブレドニゾン)を含む。有益な第二世代の化学療法的養生法は、m-BACOD (メトトレキセート、プレオマイシン、ドキソルビシン、シクロフオスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾン、及びロイコボリン)である一方、適切な第三世代養生法は、MACOP-B (メトトレキセート、ドキソルビシン、シクロフオスファミド、ビンクリスチン、ブレドニゾン、プレオマイシン及びロイコボリン)である。更なる有益な薬剤は、フェニル酪酸及びプロスタチン-1である。好適な多様式治療では、化学療法薬剤及びサイトカインの両方が、本発明に従って、抗体、免疫複合体、又は融合蛋白と共に投与される。サイトカイン、化学療法的薬剤、及び抗体、免疫複合体又は融合蛋白を、如何なる順番でも又は一緒に投与することが可能である。

#### 【0091】

一般に、投与される抗CD22及び抗CD19抗体、抗CD22及び抗CD19抗体成分、免疫複合体及び融合蛋白の投与量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態、及び以前の医療歴のような要因により変化する。典型

的には、状況次第で、投与量は上下するが、レシピエントに、およそ1 p g / k g から1 0 m g / k g (薬剤量/患者の体重)までの範囲の抗体成分、免疫複合体、又は融合蛋白の投与量を供与することが好ましい。

#### 【0092】

患者に対する抗体成分、免疫複合体、又は融合蛋白の投与は、静脈注、動脈注、腹腔内注、筋肉内注、皮下注、胸膜腔内注、髄腔内注、局部のカテーテルを介する灌流又は直接の病巣内注射である。治療蛋白を注射で投与する時、投与は、持続注入或いは、単回又は多回ボースによってもよい。

#### 【0093】

当業者は、素早く抗体を分布させる際に循環が徹底することから、静脈注射が有益な投与様式を提供することに気づいている。しかし、静脈投与は、血管系の内皮細胞及び内皮細胞下のマトリックスからなる血管のバリアにより制限対象となる。更に、血管のバリアは、固形腫瘍による治療用抗体の取り込みにたいして、より顕著な課題である。リンパ腫は効果的な抗体送達に寄与する比較的高血流速度を有する。皮下注射又は筋肉内注射のような投与、或いはリンパ管のカテーテル化による投与のようなリンパ内投与経路もまた、リンパ腫を治療する有用な手段を提供する。

#### 【0094】

好ましくは、裸の抗CD22抗体又は裸の抗CD19抗体は、一投与につき20～1500ミリグラムの低蛋白投与量で、単回又は繰り返し非経口的に投与される。代替的に、裸の抗CD22抗体又は裸の抗CD19抗体は、一投与につき20～1000ミリグラムの投与量で、又は、一投与につき20～500ミリグラムの投与量で、又は一投与につき20～100ミリグラムの投与量で投与される。

#### 【0095】

上述したように、本発明は又、裸の抗CD22抗体成分又は裸の抗CD19抗体成分が免疫複合体投与又は融合蛋白投与で補強される治療方法もまた企図している。一の変形では、裸の抗CD22抗体又は裸の抗CD19抗体は、低用量の放射性ラベル化した抗CD22又は抗CD19抗体又は断片と共に投与される。

二つ目の代替として、裸の抗CD22抗体又は裸の抗CD19抗体は、低用量の放射性ラベル化した抗CD22サイトカイン免疫複合体又は抗CD19サイトカイン免疫複合体と共に投与される。三つ目の代替として、裸の抗CD22抗体又は裸の抗CD19抗体は、放射性ラベル化されていない抗CD22サイトカイン免疫複合体又は抗CD19サイトカイン免疫複合体と共に投与される。<sup>131</sup>Iラベル化した免疫複合体の「低用量」に関して、好適な投与量は、15から40mCiの範囲である一方、最も好適な範囲は、20～30mCiである。対照的に、<sup>90</sup>Yラベル化した免疫複合体の好ましい投与量は、10から30mCiの範囲である一方、最も好適な範囲は、10から20mCiである。好ましい抗体成分は、マウスのLL2モノクローナル抗体、キメラのLL2抗体、及びヒト化したLL2抗体を含有するLL2抗体に由来する抗体及び断片を含む。

#### 【0096】

熱中性子放射線治療のためのホウ素付加物を負荷した担体を有する免疫複合体は、通常同様の方法で、効果をもたらすであろう。しかし、中性子照射が行われる前に標的化によって集まっていない免疫複合体が消失するまで待つのが有利である。クリアランスは、その免疫複合体に結合する抗体を用いて加速されることが可能である。この一般的な原理の説明を得るためには、米国特許No. 4, 624, 846を参照のこと。

#### 【0097】

単独の又はリボソームへ複合体化された抗CD22又は抗CD19抗体成分、免疫複合体、及び融合蛋白は、既知の方法に従って、製剤化して薬学的有用な組成物を調製することが可能である。それにより、治療用の蛋白は、混合物内で薬学的に許容される担体との混合物にされる。もし、被験患者が組成物の投与に耐えうる場合、組成物は「薬学的に許容される担体」である、と言われている。無菌のリン酸緩衝化した生理食塩水は、薬学的に許容される担体の一例である。他の適切な担体は、当業者に公知である。例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed., (1995)を参照のこと。

#### 【0098】

治療の目的のために、抗体組成物（又は免疫複合体／融合蛋白）及び薬学的に許容される担体は治療的に効果をもたらす量で、患者に投与される。場合によっては、抗体組成物の免疫複合体／融合蛋白及び薬学的に許容される担体との組み合わせは、もし、投与される量が生理学的に意義がある場合、「治療的に効果をもたらす量」で、投与されると言われている。剤は、もし、被験患者の生理学において、検出可能な変化をその存在がもたらす場合、生理学的に意義がある。これに関して、剤は、もしその存在が標的腫瘍細胞の成長阻害をもたらす場合、生理学的に意義がある。

#### 【0099】

更なる薬学的な方法が、治療的な応用で抗体成分、免疫複合体、又は融合蛋白の作用継続期間を制御するために用いられる。制御放出調製物は、ポリマーを用いて抗体成分、免疫複合体、又は融合蛋白を複合体化したり吸着させることを介して調製することが可能である。例えば、生体適合性のポリマーは、エチレンービニル酢酸共重合体のマトリックス、ステアリン酸二量体及びセバチン酸のポリ無水物共重合体のマトリックスを含む。Sherwoodら、Bio/Technology 10:1446 (1992)。このようなマトリックスからの抗体成分（又は免疫複合体）の放出速度は、蛋白の分子量、マトリックス内の抗体成分／免疫複合体／融合蛋白の量、及び分散された粒子の大きさによる。Saltszmanら、Biophys. J. 55:163 (1989)；及び上述のSherwoodらを参照せよ。その他の固形投与形態は、REMITON<sup>1</sup> S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19th ed. (1995) に説明されている。

#### 【0100】

本発明は、又、免疫調節剤が、放射線で誘発された、又は薬剤で誘発された正常細胞の、特に造血細胞の、毒性を防止したり、軽減したり、又は後退させるために投与される治療の方法をも企図している。免疫調節剤の補助治療は、被験哺乳動物の耐性増加によって、細胞毒性剤の多めの量の投与を可能にする。さらに、免疫調節剤の補助治療は、投与量を制限する骨髓毒性を防止したり、緩和したり、又は後退させたりすることが可能である。補助的治療に適した免疫調節剤の

例は、G-CSF、GM-CSF、トロンボポイエチン、IL-1、IL-3、IL-12などを含む。補助的な免疫調節剤治療の方法は、Goldengerg, 米国特許No. 5, 120, 525により開示されている。

【0101】

例えば、組み替えIL-2は、 $6 \times 10^5$  IU/kgでボーラスとして、又は、 $18 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/dの投与量で持続注入として静脈内に投与してもよい。Weissら、J. Clin. Oncol. 10:275 (1992)。又、組み替えIL-2は、 $12 \times 10^6$  IUの投与量で皮下に投与してもよい。Vogelzangら、J. Clin. Oncol. 11:1809 (1993)。更に、INF- $\gamma$ を $1.5 \times 10^6$  Uの投与量で皮下に投与してもよい。Lienardら、J. Clin. Oncol. 10:52 (1992)。更に又、Nadeauら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 274:78 (1995)は、アカゲザルにおいて単回の組み替えIL-12 (42.5  $\mu$ g/kg) の静脈内投与がINF- $\gamma$ レベルを上昇させたことを示している。

【0102】

適切なIL-2製剤はPROLEUKIN (Chiron Corp./Cetus Oncology Corp.: Emeryville, CA) 及び、TECELEUKIN (Hoffmann-La Roche, Inc.: Nutley, NJ) を含む。ACTIMMUNE (Genentech, Inc.: South San Francisco, CA) は、適したINF- $\gamma$ 調製剤である。

【0103】

このように一般的に説明された本発明は、以下の実施例を参照にして、更に容易に理解されるであろうが、以下の実施例は例を用いて提示されており、本発明を制限することを意図するものではない。

【0104】

実施例1

リンパ節及び骨髄に無痛性リンパ腫を有する患者の治療

患者はビマン性の大細胞急速進行性リンパ腫を呈している。患者をCOPに置いて、最小限の応答があった。7ヶ月後に、患者は、CDA治療を受け、良好な応答があった。しかし、15ヶ月後に患者は、進行性のリンパ節症の特徴を呈し、この7ヶ月後に骨髄の広範囲にわたるリンパ腫の浸潤、広範囲にわたる首、胸、腹部、骨盤のリンパ節腫脹、並びに肝脾肥大があることが判明した（0日目）。

【0105】

患者はその後、ヒト化したhLL2モノクローナル抗体を用いた治療を開始した。634mgのヒト化hLL2抗体を患者に静脈注射した。この治療は、この最初の治療に続いて、6、13、および20日目に繰り返された。最終投与の直後に、hLL2の血清値は、389.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、最終投与の1ヶ月後にはhLL2の血清値は186.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0106】

hLL2の最終投与の5ヶ月後には、患者が受けたCTスキャンは、リンパ腫の明証が無く、巨脾腫が消散し、肝臓異常が無いことを示し、続いて行なったパラフィン処理組織のCD20及びCD3のイムノパーオキシダーゼ染色を用いた組織学的検索は、骨髄にリンパ腫の明証を示さなかった。hLL2での治療前の血液中の正常なB細胞は、治療後2ヶ月時点では血液から完全に枯渇していた。治療後5ヶ月で最小限の正常B細胞が再出現した。結果を以下の表に示す。

【0107】

【表1】

【表2】  
【0108】

骨髄中のB細胞およびT細胞

| 日   | %骨髄 B 細胞   |      |                  |                 | %骨髄 T 細胞 |  | %骨髄 HLA-Dr (Ia) |  |
|-----|--|------|------------------|-----------------|----------|--|-----------------|--|
|     | CD19   | CD20 | hcl <sup>+</sup> | γδ <sup>+</sup> | CD3      |  |                 |  |
|     | 7E-4抗体トリ-  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 0   | 12   | 15   | 20               | 3               | 7        |  | 20              |  |
|     | 従来の組織学   |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 0   | 2つの吸引液中の30および40%の悪性リンパ腫細胞  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 28  | hLL2 治療  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 34  | hLL2 治療  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 41  | hLL2 治療  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 48  | hLL2 治療  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
|     | 7E-4抗体トリ-  |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 203 | 3  | 1    | 1                | <1              | 32       |  | 2               |  |
|     | CD20 および CD3 のためのh <sup>+</sup> ラインで包埋した組織切片のh <sup>+</sup> h <sup>+</sup> -h <sup>+</sup> h <sup>+</sup> 染色 |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 203 |  | 5    |                  |                 | 95       |  |                 |  |
|     | 従来の組織学   |      |                  |                 |          |  |                 |  |
| 203 | 骨髄形成不全のある小リンパ球集合体細胞性質不全  |      |                  |                 |          |  |                 |  |



血液中のB細胞およびT細胞

| 日   | T4/T8 | %血液 B細胞  | CD19 | CD20 | CD45° | %血液 T細胞 | %血液 HLA-Dr (1a) |
|-----|-------|----------|------|------|-------|---------|-----------------|
|     |       | 70-サイトリ- |      |      | 74.5° | CD3     |                 |
| 0   | 1.5   | 5        | 5    | 6    | 2     | 38      | 6               |
| 28  |       | hLL2 治療  |      |      |       |         |                 |
| 34  |       | hLL2 治療  |      |      |       |         |                 |
| 41  |       | hLL2 治療  |      |      |       |         |                 |
| 48  |       | hLL2 治療  |      |      |       |         |                 |
|     |       | 70-サイトリ- |      |      |       |         |                 |
| 76  | 1.3   | <1       | <1   | <1   | <1    | 71      | 6               |
| 191 | 2.0   | 1        | 1    | <1   | <1    | 73      | 4               |

【0109】

# 実施例 2

肺及び肝臓に急速進行性ヒマン性大細胞リンパ腫を有する患者への治療

患者は肺及び肝臓に広範囲にわたる大細胞悪性リンパ腫を呈している。患者は

CHOPに対して良好だが短かい応答がある。7ヶ月後に患者は骨髄移植とともに高投与量の化学療法を受けた。10ヶ月後に患者は肺、肝臓に、及びリンパ節腫脹で再発し、患者をRituxanの標準投与量を4回用いて治療した。患者にはRituxanに対して僅かな応答があったが、その応答は3ヶ月足らずしか持続しなかった。患者はその後、Rituxanを用いた2回目の治療はうまく行かず、患者は肺、肝臓に、及びリンパ節腫脹で進行性のリンパ腫を有する特徴が見られた(0日目)。

【0110】

患者はその後、ヒト化したLL2モノクローナル抗体を用いた治療を開始した。患者に556mgのヒト化したLL2モノクローナル抗体を静脈内に持続注入した。治療はこの初回の治療に続いて5、12、及び19日目に繰り返された。最終投与の直後のhLL2の血清値は279.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、最終投与の1ヶ月後のhLL2の血漿値は99.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

【0111】

治療前の患者のCTスキャンは、三つの肺の病巣がそれぞれ3.96  $\text{cm}^2$ 、4.83  $\text{cm}^2$ 、及び4.6  $\text{cm}^2$ であることを示した。hLL2の最終投与後1ヶ月後の患者のCTスキャンは、肺の病巣がそれぞれ0  $\text{cm}^2$ 、1.21  $\text{cm}^2$ 、及び0.81  $\text{cm}^2$ に減少したことを示した。hLL2の最終投与後4ヶ月半では、CTスキャンは三つの病巣がそれぞれ0  $\text{cm}^2$ 、1  $\text{cm}^2$ 、及び0  $\text{cm}^2$ に減少したことを示した。

【0112】

治療前の血中における正常なB細胞は、著しく減少していたが、それは恐らくRituxan治療のせいと思われる。治療後1ヶ月後に、正常なB細胞が最小限再出現した。結果は以下の表に示されている。

【0113】

【表3】

【表 4】  
【0114】

骨髄中のB細胞およびT細胞

| 日  | %骨髄 B 細胞    |      |       |      | %骨髄 T 細胞 |  | %骨髄 HLA-Dr (Ia) |
|----|-------------|------|-------|------|----------|--|-----------------|
|    | CD19        | CD20 | h771° | 7L2° | CD3      |  |                 |
|    | 7H-5(1:51)- |      |       |      |          |  |                 |
| 0  |             | 80   |       |      | 20       |  |                 |
|    | 従来の細胞学      |      |       |      |          |  |                 |
| 28 | リンパ腫陰性      |      |       |      |          |  |                 |
| 28 | hLL2 治療     |      |       |      |          |  |                 |
| 33 | hLL2 治療     |      |       |      |          |  |                 |
| 40 | hLL2 治療     |      |       |      |          |  |                 |
| 47 | hLL2 治療     |      |       |      |          |  |                 |

【表5】

血液中のB細胞およびT細胞

| 日  | T4/T8 | %血液B細胞  |      |      | %血液T細胞 |     |     | %血液HLA-Dr<br>(1a) |
|----|-------|---------|------|------|--------|-----|-----|-------------------|
|    |       | CD19    | CD20 | CD22 | CD3    | CD4 | CD8 |                   |
| 0  | 0.5   | <1      | <1   | <1   | <1     | <1  | 57  | 4                 |
| 28 |       | h1L2 治療 |      |      |        |     |     |                   |
| 33 |       | h1L2 治療 |      |      |        |     |     |                   |
| 40 |       | h1L2 治療 |      |      |        |     |     |                   |
| 47 |       | h1L2 治療 |      |      |        |     |     |                   |
| 48 | 0.3   | <3      | 1    | <1   | <1     | <1  | 68  | 4                 |
| 76 | 0.4   | <1      | <1   | 1    | 1      | 1   | 63  | 15                |

【0116】

実施例3

再発した中級の非ホジキンリンパ腫を有する患者の治療

中級の非ホジキンリンパ腫のある患者は前に行われたCHOP x 6からなる積

CTスキャンの結果

| 病巣位置  | 19日目              | 50日目 | 182日目 |
|-------|-------------------|------|-------|
|       | 平方センチで表示した病巣のサイズ* |      |       |
| 左肺窩   | 6.82              | 4.18 | 消散した  |
| 門脈大静脈 | 20.16             | 5.04 | 消散した  |
| 下大静脈  | 5.72              | 3.24 | 消散した  |
| 大動脈   | 4.00              | 2.88 | 消散した  |

極的な化学療法でうまくいかなかったが、この治療では、CHOP × 6 で5ヶ月間寛解となり、別のCHOP × 6 コースで進展し、D-MOPP × 2 で6ヶ月間の安定した病状となり、末梢血幹細胞移植を併用したCVBで4ヶ月間の部分的な寛快が得られていた。患者は、胸部及び頸部リンパ結節にCT及び触診それぞれで測定可能な再発したリンパ腫を呈する。

#### 【0117】

患者は、50mgのヒト化したLL2モノクローナル抗体を2日、5日、9日、12日と連続2週間副作用が見られることなく注射を受ける。3週間後の頸部肥太結節の触診では、およそ60%の測定可能な減少があり、一方、繰り返した行った胸部のCTスキャンでは、腫瘍の70%の著しい減少があった。治療後10週目に行われた追跡測定では、胸部及び頸部で疾患の明証はなかった。何処にも新発の疾患は検出されないで、患者は完全寛解の状態にあるとみなされる。10～12週間毎の追跡調査では少なくとも治療後16ヶ月間の完全寛解を確認している。

#### 【0118】

##### 実施例4

弥漫性大細胞急速進行性リンパ腫を有する患者のCHOP及びhLL2を用いた治療

患者はヒマン性大細胞急速進行性リンパ腫を呈しており、腹部に大きい疾患、その他の数多くの部位にリンパ節外性疾患、及び血清乳酸脱氢酶素（LDH）の上昇を有する思わしくない予後をもつと診断される。患者はCHOPに置かれ、3サイクルの治療後に、部分的応答が腹部外での数多くの部位の節外性疾患の消散で観察される。しかし、腹部の大きい疾患は、増大し続け、血清LDHは上昇したままである。

#### 【0119】

CHOPの3サイクル目を開始次第、患者に50mgのヒト化したLL2モノクローナル抗体を1、5、9、及び12日目に持続注入する。このhLL2の治療的養生法は、CHOPをあと4サイクル付随して繰り返される。治療中に血清LDHレベルは、正常領域に落ちる。CHOP及びhLL2の3サイクル目の1

ヶ月後に、腹部にある大きい腫瘍のCTスキャンは、この塊の90%を超える退縮を示す。10～12週間毎の追跡調査は、治療後9ヶ月間以上にわたって完全寛解を確認する。

#### 【0120】

##### 実施例5

再発した急速進行性大細胞リンパ腫を有する患者のhLL2およびhLL2-I L2を用いた治療

播種性大細胞急速進行性リンパ腫がある患者は、初めのライン（CHOP）化学療法及び二番目のライン（m-BACOD）化学療法に应答するが、三番目のライン化学療法（MACOP-B）はうまく行かない。三番目のライン化学療法の完了後、患者は骨髄に播種性疾患、大きな塊の脾臓、触診可能な肥化したリンパ節を数多くの部位に持つ。患者はその後50mgのヒト化したLL2を2、5、9、および12日目に持続注入される。この養生法は、2週間毎に4週間繰り返される。骨髄疾患は、hLL2治療に漸次応答し、結節の大きさも小さくなる。しかし、多くの結節はまだ触診が可能で、脾臓の大きさにはほとんど減少が観察されない。2週間毎のhLL2治療が続く間に患者は、10mgのhLL2-I L2融合蛋白での治療も受ける。初回の治療の後に脾臓の大きさに顕著な減少があり、また、第二回目のhLL2/hLL2-I L2治療の後に結節は触診出来なくなり、脾臓は更に大きさが減少していた。疾患の進行は6ヶ月間以上観察されない。

#### 【0121】

前述したことは、特定の好適実施形態を参照しているが、本発明はそうに制限されないことを理解されよう。開示された実施形態に種々の変形がなされたり、また、この変形が本発明の範囲内においてなされることは一般の当業者にあり得ようが、それは以下の請求項に定義されるものである。

#### 【0122】

この明細書に言及した全ての刊行物、特許申請は、本発明が関係する当業者の熟練レベルを表すものである。これらの個々の刊行物及び特許出願は、それぞれが、明確にかつ個別に、その全体がそのまま引用され、これらの全ての刊行物及

び特許出願は、本明細書の記載の一部とされる。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/12583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/395 A61K38/19 A61P35/00 //(A61K39/395,38:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOISIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | S KIESEL ET AL.: "Removal of cells from a malignant B-cell line from bone marrow with immunomagnetic beads and with complement and immunoglobulin switch variant mediated cytotoxicity." LEUKEMIA RESEARCH, vol. 11, no. 12, 1987, pages 1119-1125, XP000929566 Oxford, GB table 1 figure 2 | 1-3, 6, 10, 12, 15-20 |
| X          | WO 98 42378 A (IMMUNOMEDICS, INC.) 1 October 1998 (1998-10-01) the whole document   | 6-10, 12-21           |

☒ X

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ X

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document (as published on or after the international filing date)

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or otherwise

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be reconsidered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"B" document: member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 July 2000

Date of mailing of the international search report

18/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5010 Patenkamp 2  
D-69001 Mannheim  
Tel. (+31-70) 340-3040 Te. 31 051 ext. 4  
Fax (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Noel, F

Form PCT/ISA (18 (Amended Sheet) July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/US 00/12583

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X   | WO 99 02567 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)<br>21 January 1999 (1999-01-21)<br>example 2<br>claims<br>-----   | 6,10,11,<br>22,23     |
| X   | O. PRESS: "Prospects for the management of non-Hodgkin's lymphomas with monoclonal antibodies and immunoconjugates."<br>CANCER JOURNAL FROM SCIENTIFIC AMERICAN, vol. 4, no. suppl. 2, July 1998 (1998-07), pages S19-S26, XP000929567<br>usa<br>table 1, esp. antibody LL8 (CD19)<br>-----                        | 1                     |
| A   | US 5 686 072 A (UHR ET AL.)<br>11 November 1997 (1997-11-11)<br>examples<br>claims<br>-----  | 10,12,<br>17,19       |
| A   | D. MALONEY ET AL.: "Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma."<br>BLOOD, vol. 84, no. 8, 15 October 1994 (1994-10-15), pages 2457-2466, XP000906990<br>New York, NY, USA<br>abstract<br>----- | 2,3,10                |
| A   | WO 96 04925 A (IMMUNOMEDICS, INC.)<br>22 February 1996 (1996-02-22)<br>examples<br>claims<br>-----   | 12,13                 |
| A   | M. GHETIE ET AL.: "A combination of immunotoxins and chemotherapy can cure SCID mice of human B cell tumors."<br>THE FASEB JOURNAL, vol. 8, no. 4, 15 March 1994 (1994-03-15), page A505 XP002143869<br>Bethesda, MD, USA<br>abstract 2925<br>-----<br>-/-   | 17-21                 |

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1993)

page 2 of 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.  
PCT/US 00/12583

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category   | Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | D. FLAVELL ET AL.: "Systemic therapy with 3B11, a triple combination cocktail of anti-CD19, -CD22, and -CD38-saporin immunotoxins, is curative of human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 21, 1 November 1997 (1997-11-01), pages 4824-4829, XP002143870 Baltimore, MD, USA abstract | 17-20                 |
| A  | R. FRENCH ET AL.: "Response of B-cell lymphoma to a combination of bispecific antibodies and saporin" LEUKEMIA RESEARCH, vol. 20, no. 7, July 1996 (1996-07), pages 607-717, XP000929562 Oxford, GB abstract figure 1  | 14-16                 |
| A  | C. RENNER ET AL.: "Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: recent results and future prospects." LEUKEMIA, vol. 11, no. suppl. 2, April 1997 (1997-04), pages S55-S59, XP000929563 Baltimore, MD, USA page S56, left-hand column, line 20 - line 52  | 1-23                  |
| P,X  | J. LEONARD ET AL.: "Epratuzumab, a new anti-CD22, humanized, monoclonal antibody for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): phase I/II trial results." BLOOD, vol. 94, no. 10 suppl. 1 part 1, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 92a-93a, XP000929541 New York, NY, USA abstract # 404  | 6-8, 12, 13, 15, 16   |

Form PCT/ISA219 (continuation of second sheet) (July 1998)

page 3 of 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/12583

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---------------------|---|--|
| WO 9842378 A                              | 01-10-1998          | AU 6761098 A<br>EP 0969866 A<br>ZA 9802438 A                                  | 20-10-1998<br>12-01-2000<br>04-11-1998                             |
| WO 9902567 A                              | 21-01-1999          | AU 3296098 A  | 08-02-1999   |
| US 5686072 A                              | 11-11-1997          | NONE  |  |
| WO 9604925 A                              | 22-02-1996          | AU 3272695 A<br>CA 2195557 A<br>EP 0771208 A<br>JP 10505231 T<br>US 5789554 A | 07-03-1996<br>22-02-1996<br>07-05-1997<br>26-05-1998<br>04-08-1998 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

| (51) Int. Cl. 7 | 識別記号   | F I     | テマコード (参考) |
|-----------------|--|---------|------------|
| A 6 1 K         | 31/475   | A 6 1 K | 31/475     |
|                 | 31/519   |         | 31/519     |
|                 | 31/573   |         | 31/573     |
|                 | 31/675   |         | 31/675     |
|                 | 31/7048  |         | 31/7048    |
|                 | 38/00  | A 6 1 P | 35/02      |
|                 | 38/21  | A 6 1 K | 37/02      |
|                 | 51/00  |         | 37/66      |
| A 6 1 P         | 35/02  |         | 43/00      |
| (81) 指定国        | EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW |         | G          |
| Fターム(参考)        | 4C084 AA02 AA03 AA12 BA44 CA62<br>DA01 DA12 DA13 DA14 DA15<br>DA18 DA21 DA22 DA23 DA24<br>DA28 MA17 MA21 MA66 NA14<br>ZB272 ZC752<br>4C085 AA14 AA15 AA16 AA25 AA26<br>AA27 BB36 BB43 BB44 CC02<br>CC13 CC22 CC23 CC24 CC29<br>CC32 DD33 DD34 DD35 DD62<br>DD63 EE01 EE03 GG02 GG03<br>GG04 GG05 GG06<br>4C086 AA01 AA02 CB09 CB21 DA10<br>DA35 EA11 MA01 MA02 MA03<br>MA04 MA17 MA21 MA66 NA14<br>ZB27 ZC75<br>4C206 AA01 AA02 DA17 HA03 HA26<br>MA01 MA02 MA03 MA04 MA37<br>MA41 MA86 NA14 ZB27 ZC75   |         |            |